

Anti-HCMV IgM plus ELISA

ELISA pour la détection d'anticorps IgM Anti-cytomégalo-virus dans du sérum et du plasma humain

Conditionnement

REF [1] 807 034 96 tests IVD coffret de tests complets

Usage prévu

Les infections par le cytomégalovirus humain (HCMV), virus de la famille des ß-herpes, sont répandues dans le monde entier (taux de prévalence 40 - 100 %). Alors qu'une infection par le HCMV est asymptomatique chez la majorité des personnes immunocompétentes, elle peut conduire à de graves complications chez les personnes dont le système immunitaire est affaibli ou ne s'est pas encore totalement développé (hépatite, rétinite, pneumonie, etc.). HCMV est l'organisme pathogène le plus fréquent des infections congénitales. Approximativement 10 % des enfants infectés congénitalement par HCMV présentent des symptômes à la naissance (ictère, hépatosplénomégalie, hémorragies pétéchiales et choriorétinite). Les receveurs de greffes d'organes et de moelle osseuse et les patients atteints du SIDA constituent d'autres groupes de patients pour lesquels une infection aiguë par HCMV est très grave. Grâce à des tests sérologiques, il est possible de différencier une infection par le CMV d'une infection par l'EBV ou par un toxoplasme. La détection d'une IgM anti-CMV est le signe d'une infection aiguë [2, 3].

Principe de la méthode - ELISA classique -

Le test anti-HCMV IgM ELISA est un titrage immunoenzymatique utilisant un antigène adsorbé (ELISA) pour le diagnostic *in vitro* IVD très sensible basé sur un mélange de différents antigènes HCMV naturels (1). Si l'échantillon testé contient des anticorps spécifiques, ils se lieront à l'antigène dans les puits de la microplaque. Les anticorps non-spécifiques sont éliminés par une étape de lavage. Pour éviter des résultats faux positifs dus aux facteurs rhumatoïdes (RF) et pour réduire la compétition avec IgG, le test doit être réalisé avec un adsorbant des RF. Le complexe anticorps-antigène formé est détecté en utilisant un anticorps monoclonal spécifique dirigé contre l'IgM humaine. La présence d'anticorps liés est mise en évidence à l'aide d'une réaction enzymatique, donnant un produit coloré, en utilisant la TMB (3,3´5,5´-tétraméthylbenzidine) comme substrat. La réaction enzymatique est arrêtée avec de l'acide sulfurique. Mesurer la densité optique à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (longueur d'onde de référence: 615-690 nm).

La trousse contient

MTP	1	**Microplaque** 12 barrettes sécables de 8 puits chacune, tapissés par différents antigènes HCMV spécifiques
NC	1,0 ml	**Contrôle CMV IgM-négatif** (prêt à l'emploi, humain) conservateur: 0,005 % de gentamicine, 0,05 % de streptomycine, 0,05 % de pénicilline V.
PC	1,0 ml	**Contrôle CMV IgM-positif** (prêt à l'emploi, humain) conservateur: 0,005 % de gentamicine, 0,05 % de streptomycine, 0,05 % de pénicilline V.
COS	1,0 ml	**Sérum seuil** (prêt à l'emploi, humain) conservateur: 0,005 % de gentamicine, 0,05 % de streptomycine, 0,05 % de pénicilline V.
DIL	45 ml	**Diluant de l'échantillon** (prêt à l'emploi) conservateur: 0,01 % de sulfate de néomycine, 0,03 % de chloramphénicol
CONJ	15 ml	**Conjugué d'anti-IgM humain** (prêt à l'emploi) Conservateur: 0,025% de pénicilline V, 0,025% de sulfate de streptomycine, 0,2% de Proclin-300.
WB	6 ml	**Tampon de lavage concentré** (500 x) conservateur: 0,01 % de 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol
SUB	13 ml	**Solution de substrat** (prête à l'emploi) Solution de 3,3´,5,5´-tétraméthylbenzidine (TMB) < 0,05 % dans H_2O. Voir avertissement et précautions.
STOP	15 ml	**Solution d'arrêt** (prête à l'emploi) Acide sulfurique < 1 N H_2SO_4
SB	1	**Sachet de conservation:** sachet en polyéthylène pour conserver les barrettes de microplaques inutilisées.
FOL	1	**Feuilles transparentes auto-adhésives:** Feuilles transparentes auto-adhésives pour recouvrir les puits des microplaques pendant l'incubation.
🕮i	1	**Notice du coffret**

Conservateurs: concentration totale < 0,11%

Matériaux nécessaires, mais non fournis avec la trousse

micropipettes, photomètre spectral (450 nm, longueur d'onde de référence 615 – 690 nm), laveur de microplaques, incubateur pour les MTP ELISA.

Avertissement et précautions

Ne pas incorporer de réactifs. Eviter le contact avec les yeux et la peau. Traiter tous les échantillons et les matières utilisées pour le test comme des produits potentiellement infectieux et prendre les mesures de sécurité appropriées. Les contrôles sont négatifs pour anti-HIV 1/2, anti-HCV, HB_SAg, anti-syphilis et les transaminases élevées. Ne pas pipeter à la bouche. Conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, porter des gants, une blouse de laboratoire et des lunettes de sécurité. Décontaminer les matières liquides et non-combustibles avec de l'hypochlorite de sodium (concentration finale: 3 %, temps d'action, au moins 30 minutes). Neutraliser obligatoirement les déchets liquides contenant des acides avant leur élimination. Autoclaver obligatoirement toutes les matières à réemployer pendant 1 heure à 121°C. La SUB est sensible à la lumière et doit être mise à l'abri de celle-ci. Le test doit être exécuté par des techniciens de laboratoire bien formés et agréés. Exécuter le test dans des conditions aseptiques et microbiologiqumenet contrôlées.

Stockage

Les réactifs, s'ils sont stockés à 2-8°C, sont stables jusqu'aux dates de péremption figurant sur chaque étiquette individuelle. Après ouverture des réactifs, ceux-ci doivent être utilisés dans les 30 jours. En cas de répétition de tests, conserver les réactifs, immédiatement après usage, à 2-8°C. Enfermer la MTP dans un sachet d'aluminium avec un déshydratant et la mettre à la température ambiante avant ouverture. Remettre les barrettes inutilisées avec le déshydratant dans le sachet refermable et les conserver ainsi à 2-8°C. Ne pas toucher avec les doigts le bord supérieur ni le fond des puits.

Préparation des réactifs

Diluer le tampon de lavage avec de l'eau déminéralisée ou désionisée (par exemple, diluer 2 ml à 1 litre). Le tampon ainsi préparé est stable pendant une semaine, conservé à 2-8°C. Tous les autres composants du test sont prêts à l'emploi. Tous les réactifs sont spécifiques d'un lot ; ne pas les utiliser avec des trousses d'autres lots. Ne pas utiliser de réactifs d'autres fabricants.

Préparation des échantillons

Utiliser des échantillons de sérum ou plasma frais, sans hémolyse. Des échantillons de sérum ou de plasma à forte lipémie, ictériques ou à contamination microbienne et des préparations d'immunoglobuline concentrées risquent de donner des résultats de test non fiables. Eviter de congeler et décongeler les échantillons à plusieurs reprises. Si les échantillons doivent être transportés, les emballer conformément aux exigences réglementaires pour le transport de matières infectieuses. Ne pas inactiver les échantillons, car il pourrait se produire des réactions non-spécifiques.

Performance du test

Suivre strictement le protocole (voir la procédure de pipetage).

Diluer tous les contrôles et échantillons dans le rapport 1:21 en utilisant le diluant de l'échantillon. Traiter au préalable les sérums des patients par le sorbant des RF (RFS). L'analyse qualitative des anticorps IgM peut être réalisée en utilisant au choix une méthode manuelle ou une méthode automatique (processeur ELISA) pour la réalisation des tests.

Dilution des échantillons au 1:21 avec prédilution dans des tubes

Diluer les contrôles PC, NC et les échantillons COS au 1:21 dans un tube (par exemple, 25 µl de contrôle ou d'échantillon + 500 µl de DIL). Bien mélanger. Les contrôles **n'ont pas** été prétraités par l'adsorbant des RF. Diluer les sérums des patients dans le rapport 1:21 également et les prétraiter par le sorbant des RF (RFS). Diluer d'abord les échantillons avec RFS, puis ajouter le diluant (par exemple, 25 µl d'échantillon + 250 µl de sorbant des RF + 250µl de diluant de l'échantillon, dilution au 1:21).

Ajouter toujours le diluant de l'échantillon en dernier. Après pipetage, bien mélanger.

Procédure de lavage

La procédure de lavage constitue un point critique. Un lavage insuffisant entraînerait une mauvaise précision et des réactions non-spécifiques.

W1: laver 5 fois avec le tampon de lavage. Pour cela, éliminer le liquide du puits et distribuer 300 µl de tampon de lavage. Remplir le puits avec au moins 250 µl de tampon de lavage (volume total 550). Répéter cette procédure de lavage 5 fois. Tapoter brièvement sur la plaque après lavage. Ne pas laisser la plaque sécher.

Calcul de la détermination qualitative

Après mesure des valeurs d'extinction à 450 nm dans tous les puits (filtre de référence: 615 - 690 nm), soustraire la valeur moyenne des blancs des valeurs d'extinction des contrôles et des échantillons. Extinction moyenne des blancs ≦ 0,100. Après soustraction du blanc, les valeurs des contrôles doivent satisfaire les critères de validité suivants:

DO moyenne de NC: ≦ 0,250 DO moyenne de PC: ≧ 0,600

Calcul de la valeur seuil et de la zone grise

La valeur seuil dépend de la DO moyenne de l'échantillon seuil (CoS $\overline{X}$).

échantillons -OD ≥	CoS-OD	échantillons Anti- HCMV positif
échantillons -OD <	zone grise	échantillons Anti-HCMV negatif
CoS-OD > échantillons -OD > CoS-OD x 0,9		zone grise (incertain)

Interprétation du résultat

Les échantillons ayant une valeur d'extinction inférieure à la zone grise sont considérés comme négatifs. Si un échantillon a une valeur d'extinction égale ou supérieure à la zone grise, il est considéré comme positif pour les anticorps IgM spécifiques de HCMV. Si la valeur de DO de l'échantillon retesté est dans la zone grise (résultat douteux), nous recommandons de demander un nouveau prélèvement.

CE 0197



189700/07 – 07/2010

Procédure de pipetage pour la détermination d'IgM

Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante avant emploi.				
Pipeter les contrôles et le blanc en dernier. Après pipetage des contrôles et des échantillons, mettre la plaque à incuber immédiatement.				
étape 1	**puits [µl]**			
	A1/B1	C1**/** D1	E1/ F1	G1**/**H1
Blanc	200 DIL			
NC double test	--	200 NC	--	--
PC double test	--	--	200 PC	--
COS	--	--	--	200 COS
échantillon 1:21 (+ adsorption des RF)	à partir de A2 200	--	--	--
Recouvrir la MTP en utilisant des feuilles auto-adhésives (inutile dans un processeur ELISA*)				
Incubation **60 ± 1 mn**, 37 ± 1°C				
Laver 5x (voir. W1)				
WB	550	550	550	550
étape 2	**puits [µl]**			
CONJ	100	100	100	100
Recouvrir la MTP en utilisant des feuilles auto-adhésives (inutile dans un processeur ELISA*)				
Incubation **30 ± 1 mn**, 37 ± 1°C				
Laver 5x (voir. W1)				
WB	550	550	550	550
étape 3	**puits [µl]**			
SUB	100	100	100	100
Incubation **30 ± 1 mn**, à la température ambiante dans l'obscurité				
STOP	100	100	100	100
Mesurer l'extinction immédiatement ou dans les 15 mn suivant l'arrêt, à 450 nm, en utilisant un spectrophotomètre spectral (longueur d'onde de référence: 615 - 690 nm).				

* En cas d'utilisation de processeurs ELISA, l'opérateur doit valider le test sous sa propre responsabilité.

Performance

200 sérums de donneurs de sang sains et 110 patients atteints d'infections HCMV aiguës à différents stades cliniques (patients greffés et immunodéprimés, confirmation par un test d'antigènémie, PCR, culture de virus ou séroconversion d'IgG, trois panels de séroconversion commerciaux) ont été testés comparativement à un ELISA de référence.

Le test IgM Plus ELISA a donné une sensibilité de 96,8 % et une spécificité de 97,6%. 20 échantillons de sérum/plasma avec EDTA héparine/plasma avec citrate ont été testés, provenant de 20 individus.10 échantillons sur les 20 ont été additionnés de sérums de patients ayant une infection HCMV aiguë. Les résultats obtenus ont été en accord pour tous les échantillons. La variabilité intra-séries du test Anti-HCMV IgM Plus ELISA a été étudiée en pipetant des échantillons réactifs dans 8 puits d'une plaque. Avec cette procédure, le coefficient de variation suivant (CV) a été obtenu: échantillon très réactif (2,8%), échantillon faiblement réactif (3,17%) et échantillon peu réactif 1,59%. La variabilité inter-séries a été évaluée en testant un échantillon dans 8 séries successives. Un CV de 7,6% a été obtenu avec les échantillons très réactifs, de 8,3% avec les échantillons faiblement réactifs et de 10,6% avec les échantillons peu réactifs. Le test Anti-HCMV IgM Plus ELISA a été évalué sur 61 échantillons suivants risquant de donner des réactions croisées: hépatite C (7), hépatite B (5), HSV (4), VZV (6), ANA (5), RF+ polyarthrite rhumatoïde (4). EBV (20), HAV (8). Des réactions croisées ont été observées avec les sérums de patients infectées par EBV et HAV.

De l'hémoglobine et de la bilirubine ont été ajoutées à 5 échantillons anti HCMV positifs et négatifs à une concentration de 4mg/ml et 0,8 mg/ml respectivement. Ces échantillons ont été comparés à des échantillons non traités. Aucune différence significative de réactivité n'a pu être observée. En outre, l'addition de 20% de trioléine (fluide lipidique) n'a pas eu d'influence sur la réactivité du test.

Limitations de la méthode

La détection d'anticorps est une méthode indirecte de détection d'un organisme pathogène. Les résultats négatifs obtenus avec le test Anti-HCMV IgM Plus ELISA n'excluent pas l'implication de HCMV dans une maladie. D'autre part, un résultat positif n'est pas suffisant pour définir une maladie. La connaissance spécifique des autres informations cliniques et des antécédents du patient constituent des prérequis importants pour interpréter correctement les données. Les méthodes directes suivantes complètent le diagnostic sérologique de HCMV: test d'antigènémie, PCR et culture du virus. Les sérums de patients atteints d'une infection primaire par EBV, positifs pour des anticorps hétérophiles, peuvent donner des résultats faux positifs sur Anti-HCMV IgM Plus ELISA. Pour l'identification, nous recommandons de prendre en compte les tests sérologiques spécifiques pour EBV et la détection des anticorps spécifiques d'anti-glycoprotéine B (gB) (Anti-HCMV rec. gB IgG ELISA, numéro de catalogue: (807 035)

Littérature

1) DIN EN ISO 980 Graphic symbols for use in the labelling of medical devices.
2) Poster:Evalation Of A Novel Anti-Cytomegalovirus Immunoglobuline M ELISA, Rothe, M. et coll., Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Erlangen, 8 au 11 avril 2002, Programme et résumés, chapitre: Diagnostic and Clinical Virology, Page 84.
3) Searching for Antibodies specific for human Cytomegalovirus: Is it Diagnostically useful? When and How, Review article, M. P. Landini et M. Mach, *Scand. J Infect Dis Suppl* 99: 18 - 23 1995

Guide de dépannage

1) Taux élevé, et inattendu, de résultats réactifs. Des échantillons ou des contrôles ont été pipetés avant le pipetage de DIL ou bien le mélange a été insuffisant.
2) Valeur moyenne du blanc supérieure au critère de validité, DO ≧ 0,100:
   a) SUB devenue bleue par oxydation ou contamination.
   b) Erreur de lavage: Effectuer l'étape des 5 cycles de lavage. Utiliser le WB de Bio-Rad contenu dans la trousse.
   c) Erreur d'incubation: température trop haute, durée d'incubation dépassée ou plaque non incubée directement après la fin du pipetage.
   d) Erreur de longueur d'onde: une mesure sans filtre de référence augmentera les valeurs de DO d'approximativement + 0,120
3) Coloration jaune dans tous les puits: (voir 2a, 2b)
   a) WB contaminé ; préparer un nouveau tampon de lavage
   b) DIL ou CONJ contaminé ; répéter le test avec des réactifs provenant de flacons encore fermés. Utiliser les réactifs dans des conditions plus aseptiques.
4) Valeur de DO moyenne de PC inférieure à ≤ 0,600:
   a) Date de péremption dépassée.
   b) Température trop basse ou durée d'incubation trop faible.
   c) Erreur de lavage: lavage trop intensif ou contact mécanique entre le distributeur et la phase solide du puits.
   d) Contamination de PC ou 3b.
5) Valeur de DO moyenne de NC supérieure à ≧ 0,250: (voir 1 et 2 a-d)
   a) NC n'a pas été pipeté après le pipetage des échantillons ; pipeter tous les échantillons avant de pipeter les blancs et les contrôles.
   b) Contamination par le couvercle du PC

Bio-Rad Medical Diagnostics GmbH
Industriestr. 1, D-63303 Dreieich, Germany
Tel.: +49-6103-801-95, Fax: +49-6103-801-724
www.bio-rad.com, techsupport.bmd@bio-rad.com

